GE Santé

illustra AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal Kit

Pour la purification des réactions de séquençage cyclique

Livret du produit

Codes : 27-5340-01 (50 purifications)
27-5340-02 (250 purifications)
27-5340-03 (1 000 purifications)

Table des matières

1. Mentions légales 3

2. Manipulation 4
2.1. Avertissements et précautions de sécurité 4
2.2. Conservation 4
2.3. Dates d'expiration 4

3. Composants 5
3.1. Contenu de la trousse 5
3.2. Éléments à fournir par l'utilisateur 5
3.3. Équipement nécessaire 5

4. Description 6
4.1. Introduction 6
4.2. Principe de base 7
4.3. Spécifications du produit 8
4.4. Résultat typique 9

5. Protocole 10
5.1. Protocole de purification des réactions de séquençage des trousses de séquençage cyclique DYEnamic ET et ABI Big Dye v3.1 10

5.2. Protocole de purification des réactions de séquençage des trousses de séquençage Thermo Sequenase Dye Terminator 12

6. Annexe 14
6.1. Calcul des tr/min à partir de la FCR 14
6.2. Guide de dépannage 15
6.3. Produits connexes 16

Carte de protocole de référence rapide Couverture arrière
Détachez la feuille contenant les protocoles pour l'utilisateur expérimenté purifiant les réactions de séquençage avec les trousses de séquençage cyclique DYEnamic ET et ABI Big Dye v3.1 ou les trousses de séquençage Thermo Sequenase Dye Terminator

1. Mentions légales

Restrictions à l'utilisation du produit
L' **illustra™ AutoSeq™ G-50 Dye Terminator Removal Kit** et ses composants ont été conçus, développés et vendus **à des fins de recherche seulement**. Ils conviennent **pour *l'utilisation in vitro* uniquement**. Aucune revendication ou représentation n'est destinée à leur utilisation pour identifier tout organisme spécifique ou pour une utilisation clinique (diagnostique, pronostique, thérapeutique ou concernant des banques de sang).

Il incombe à l'utilisateur de vérifier l'utilisation des **illustra AutoSeq G-50 columns** pour une application spécifique, car les caractéristiques de performance de ce produit n'ont pas été vérifiées pour un quelconque organisme spécifique.

GE imagination à l'oeuvre et GE monogram sont des marques déposées de General Electric Company.

illustra, NICK, AutoSeq, Sephadex, MicroSpin, ProbeQuant, GFX, NAP, DYEnamic et Thermo Sequenase, TempliPhi, MegaBACE et Ready-To-Go sont des marques déposées des sociétés de GE Santé.

Toutes les marques déposées de tiers sont la propriété de leurs propriétaires respectifs.

© 2006-2010 General Electric Company – Tous droits réservés.
Édition précédente 2006.

Tous les biens et services vendus sont sous réserve des modalités de vente de la société au sein de GE Santé qui les fournit. Un exemplaire des présentes modalités est disponible sur demande. Contactez votre représentant GE Santé pour les informations les plus récentes (voir la couverture arrière pour les coordonnées).

http://www.gelifesciences.com

GE Santé UK Limited.
Amersham Place, Little Chalfont,
Buckinghamshire. HP7 9NA UK.

2. Manipulation

2.1. Avertissements et précautions de sécurité

Avertissement : Utiliser uniquement à des fins de recherche.
Non recommandé ni destiné au diagnostic des maladies chez l'homme ou l'animal. Usage interne ou externe interdit chez l'homme ou l'animal.

Tous les produits chimiques doivent être considérés comme potentiellement dangereux. Seules les personnes formées aux techniques de laboratoire et familières avec les principes des bonnes pratiques de laboratoire doivent manipuler ces produits. Porter des vêtements de protection appropriés, comme des sarraus de laboratoire, des lunettes de sécurité et des gants. Prendre soin d'éviter tout contact avec la peau ou les yeux; en cas de contact, laver immédiatement à l'eau (voir la ou les fiches signalétiques et/ou la ou les déclarations de sécurité pour les recommandations spécifiques).

2.2. Conservation

Tous les composants de la trousse doivent être conservés à température ambiante (20-25 °C). **Ne pas congeler**.

2.3. Dates d'expiration

Pour la date d'expiration, veuillez vous référer à l'étiquette sur l'emballage extérieur.

3. Composants

3.1. Contenu de la trousse

Identification	Taille de l'emballage No de la cat.	50 purifications 27-5340-01	250 purifications 27-5340-02	1 000 purifications 27-5340-03
	illustra™ AutoSeq™ G-50 Columns	50	250	1 000
	Tubes de collecte et bouchons	50	250	1 000

Se reporter au certificat d'analyse pour une liste complète des composants de la trousse.

3.2. Éléments à fournir par l'utilisateur

Jetables :
Microtubes de centrifugation de 1,5 ml sans DNase

Produits chimiques :
Lors de la purification des réactions de séquençage des trousses de séquençage Thermo Sequenase™ Dye Terminator, 100 µl d'EDTA à 10,5 mM (pH 8) sont nécessaires pour chaque purification.

3.3. Équipement nécessaire

Microcentrifugeuse capable d'accueillir des microtubes de centrifugation de 1,5 ml
Mélangeur à tourbillon

4. Description

4.1. Introduction

illustra AutoSeq G-50 columns contiennent de l'ADN de résine Sephadex™ de qualité F. Elles permettent l'élimination du colorant terminateur des réactions de séquençage par le procédé de filtration sur gel. Les molécules plus grosses que les pores les plus larges dans la Sephadex sont exclues du gel et sont éluées en premier. Les molécules de taille intermédiaire pénètrent dans la matrice à des degrés variables, en fonction de leur taille et de la résine utilisée. La pénétration de la matrice retarde la progression dans la colonne; les très petites molécules sont éluées en dernier. Le volume requis pour éluer ces petites molécules dépend du volume disponible à l'intérieur et à l'extérieur des pores, c'est-à-dire le volume du lit.

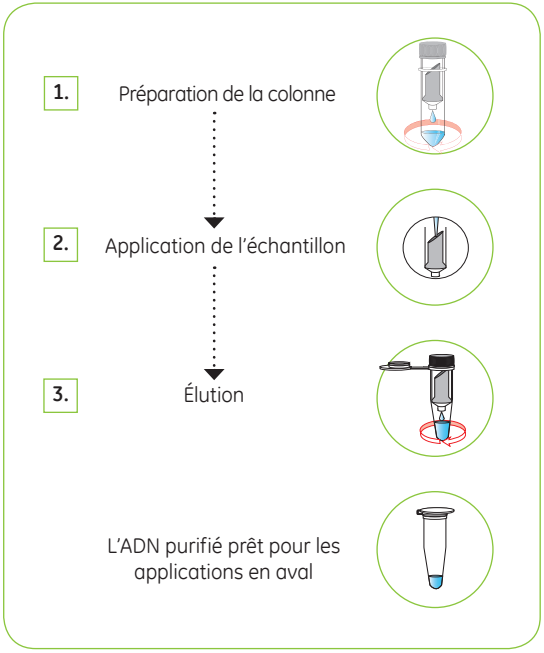
Les résines de filtration sur gel ne présentent pas une limite d'exclusion fixe lorsqu'elles sont utilisées dans un format de colonne rotative. Les limites d'exclusion des résines de filtration sur gel ne sont significatives que dans les processus de flux continu où les molécules étant purifiées ont suffisamment de temps pour atteindre l'équilibre entre le temps passé dans le milieu de filtration sur gel et le temps passé dans le courant de l'éluant. Dans la chromatographie à colonne pivotante, les propriétés d'exclusion observées qui permettent au produit de passer à travers le gel tandis que les impuretés plus petites sont retenues dépendent de facteurs expérimentaux comme : la résine utilisée, le volume de l'échantillon, la taille des produits et les forces d'accélération utilisées dans le procédé de purification.

Les illustra AutoSeq G-50 columns sont préparées pour la purification des réactions de séquençage marquées par du colorant terminateur. La trousse de séquençage cyclique GE Santé DYEnamic™ ET terminator peut être utilisé pour préparer des réactions de séquençage pour analyse sur des analyseurs de séquence MegaBACE™ de GE Santé. En variante, la trousse de séquençage cyclique ABI™ BigDye™ v3.1 (PE Corporation) (numéro de catalogue 4337454) peut être utilisé pour préparer des réactions pour analyse par tous les analyseurs de séquence ABI communs (par exemple 377, 3730XL).

Le protocole fourni avec illustra AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal Kit a été optimisé pour la purification des réactions de séquençage seulement. GE Santé fournit une gamme de produits de purification des acides nucléiques pour d'autres applications (voir la section 6.3).

4.2. Principe de base

L'utilisation des **illustra AutoSeq G-50 columns** comprend les étapes suivantes :



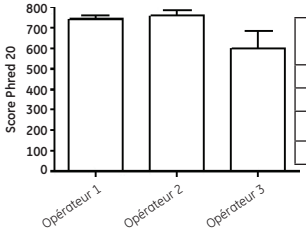
Étape	Commentaires	Composant
1. Préparation de la colonne	La résine est remise en suspension et le tampon de stockage en excès est éliminé par centrifugation.	**illustra AutoSeq G-50 column**
2. Application de l'échantillon	L'échantillon est appliqué à la colonne.	
3. Élution	L'échantillon purifié est élué par centrifugation.	

4.3. Spécifications du produit

Type d'échantillon :	Réactions de séquençage automatisées
Principe	Filtration sur gel
Matrice de la colonne	ADN Sephadex G-50 de qualité F
Tampon de conservation de la colonne	Eau distillée contenant du biocide Kathon™ CG/ICP à 0,15 % comme agent de conservation.
Volume de l'échantillon d'entrée	12–25 µl
Essai à nucléase	Les composants de la colonne sont testés dans des épreuves « nickase », exonucléase à simple et à double brin et RNase.
Applications ultérieures importantes	Dépendent de l'échantillon d'entrée, mais incluent des applications de transfert et de séquençage.

4.4. Résultat typique

Figure 1 : Résultats typiques de séquençage de l'ADN



Séquençage de l'ADN	Longueur de lecture moyenne Phred 20
Opérateur	illustra
1	740,3
2	755,8
3	597

Un stock en vrac de réactions de séquençage avec la trousse de séquençage cyclique BigDye Terminator v3.1 a été préparé en utilisant un plasmide à base de pUC contenant le cadre de lecture ouvert TP53 (protéine tumorale p53) comme matrice et des amorces de séquençage avant et arrière M13. Les aliquotes de ce stock en vrac ont été purifiés par trois opérateurs différents. Les réactions de séquençage purifiées ont été analysées par un fournisseur de services de séquençage externe à l'aide d'un analyseur d'ADN ABI PRISM™ 3730XL.

5. Protocole

Remarque : Les colonnes NE sont PAS transférables entre les trousses GE Santé, par exemple, la composition des colonnes AutoSeq G-50 n'est pas la même que la composition des colonnes MicroSpin™ G-50.

Utilisation des icônes
La légende ci-dessous décrit la fonction des icônes utilisées dans le livret du protocole.

Cette icône est utilisée pour mettre en évidence les étapes particulièrement critiques à respecter dans le protocole. Le non-respect de ces conseils aura un impact négatif sur les résultats.

Cette icône est utilisée pour mettre en évidence les conseils techniques qui améliorent la description de l'étape. Ces conseils peuvent indiquer les zones de flexibilité dans le protocole ou fournir une recommandation pour optimiser le rendement de la trousse.

Voir les sections 3.2 et 3.3 pour les matériaux et équipements à fournir par l'utilisateur.

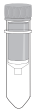
5.1 Protocole pour la purification des réactions de séquençage des trousses de séquençage cyclique DYEnamic ET et ABI BigDye v3.1

1. Préparation de la colonne

a. Remettre la résine en suspension dans la colonne en la faisant tourbillonner.

b. Desserrer le bouchon d'un quart de tour et enlever la fermeture inférieure en la tournant.

c. Placer la colonne dans le tube de collecte fourni pour le support.



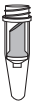
d. Centrifuger pendant 1 minute à 2 000 × g.

Remarque : Voir la section 6.1 pour le calcul des tr/min de la FCR.

Remarque : Utiliser les colonnes immédiatement après la préparation pour éviter le dessèchement de la résine. Si la résine de la colonne semble sèche, déplacée ou fissurée après le premier tour, cela indique généralement une surcentrifugation (trop rapide ou trop longue). Réhydrater la colonne avec 250 µl d'eau distillée stérile sans nucléase, faire tourbillonner et répéter la centrifugation, en vérifiant les réglages. La vitesse de rotation peut être réduite de 20 % si nécessaire.

Ne pas utiliser le bouton d'impulsion sur la microcentrifugeuse, car cela peut annuler le réglage de la vitesse.

e. Procéder immédiatement à l'étape 2 ci-dessous.



2. Application de l'échantillon

a. Placer la colonne dans un nouveau microtube de centrifugation de 1,5 ml sans DNase (fourni par l'utilisateur).

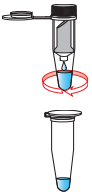
b. Appliquer lentement 12–25 µl d'échantillon en haut au centre de la résine, en faisant attention de ne pas perturber le lit de résine.

Remarque : La résine se sera écartée légèrement de la colonne pour former un pilier. Il est essentiel d'appliquer lentement l'échantillon étant purifié et de ne pas le laisser s'écouler sur les côtés du lit de résine. Éviter de toucher le lit de résine avec l'embout de la pipette.

3. Élution

a. Centrifuger pendant 1 minute à 2 000 × g. L'échantillon purifié est recueilli dans le fond du microtube de centrifugation de 1,5 ml.

b. Procéder conformément aux instructions fournies avec l'analyseur d'ADN, ou conserver l'échantillon purifié à -20 °C.



5.2 Protocole pour la purification des réactions de séquençage des trousses de séquençage Thermo Sequenase Dye Terminator

1. Préparation de la colonne

a. Retirer le bouchon supérieur et ajouter 100 µl d'EDTA à 10,5 mM (pH 8) à la résine.

b. Remettre le bouchon en place.

c. Remettre la résine en suspension dans la colonne en la faisant tourbillonner.

d. Desserrer le bouchon d'un quart de tour et enlever la fermeture inférieure en la tournant.

e. Placer la colonne dans le tube de collecte fourni pour le support.

f. Centrifuger pendant 1 minute à 2 000 × g.

Remarque : Voir la section 6.1 pour le calcul des tr/min de la FCR.

Remarque : Utiliser les colonnes immédiatement après la préparation pour éviter le dessèchement de la résine. La vitesse de rotation peut être réduite de 20 % si nécessaire.

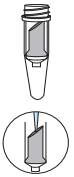
Ne pas utiliser le bouton d'impulsion sur la microcentrifugeuse, car cela peut annuler le réglage de la vitesse.

g. Procéder immédiatement à l'étape 2 ci-dessous.

2. Application de l'échantillon

a. Placer la colonne dans un nouveau microtube de centrifugation de 1,5 ml sans DNase (fourni par l'utilisateur).

b. Appliquer lentement 12–25 µl d'échantillon en haut au centre de la résine, en faisant attention de ne pas perturber le lit de résine.

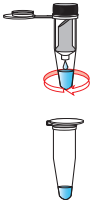


Remarque : La résine se sera écartée légèrement de la colonne pour former un pilier. Il est essentiel d'appliquer lentement l'échantillon étant purifié et de ne pas le laisser s'écouler sur les côtés du lit de résine. Éviter de toucher le lit de résine avec l'embout de la pipette.

3. Élution

a. Centrifuger pendant 1 minute à 2 000 × g. L'échantillon purifié est recueilli dans le fond du microtube de centrifugation de 1,5 ml.

b. Procéder conformément aux instructions fournies avec l'analyseur d'ADN, ou conserver l'échantillon purifié à -20 °C.



6. Annexes

6.1. Calcul des tours par minutes à partir de la force centrifuge relative

La centrifugation appropriée pour un rotor spécifique peut être calculée à partir de la formule suivante :

tr/min = 1 000 × √(FCR/1,12r)

Où FCR = la force centrifuge relative; r = le rayon en mm, mesuré à partir de l'axe de la broche jusqu'à la partie inférieure du godet de rotor; et tr/min = tours par minute.
Par exemple, si une FCR de 735 × g est nécessaire, en utilisant un rotor avec un rayon de 73 mm, le nombre de tours par minute correspondant serait de 3 000.

Le Tableau 2 ci-dessous montre les tr/min appropriés pour diverses microcentrifugeuses.

Tableau 2 : Tr/min appropriés pour une FCR de 2 000 × g

Microcentrifugeuse	**Tr/min appropriés pour une FCR de 2 000 × g**
Heraeus Biofuge 15	4 600
Beckman GS15R	3 600
Hettich Mikro 24-48	4 300
Hettich Mikro EBA12	4 400
Eppendorf Centrifuge 5415C	4 900
Eppendorf Centrifuge 5417C	4 400

6.2. Guide de dépannage

Ce guide peut être utile dans un premier temps. Cependant, si les problèmes persistent ou pour de plus amples informations, veuillez contacter les services techniques de GE Santé. Les numéros de téléphone se trouvent sur la dernière page. Vous pouvez également vous connecter sur http://www.gelifesciences.com/illustra

Problème : Degré de pureté médiocre de l'échantillon

Cause possible	Suggestions
Intensité faible du signal	• Vérifiez que le volume de l'échantillon était de 12 µl avant le chargement. Si vous n'êtes pas certain de l'étalonnage de votre pipette, nous recommandons d'augmenter le volume de l'échantillon à 20 µl avec de l'eau distillée avant le chargement. • Vérifiez que le volume de l'échantillon n'était pas supérieur à 20 µl avant le chargement • Vérifiez que l'échantillon est SOIGNEUSEMENT ajouté dans le centre de la résine. Ne perturbez pas la colonne. Ne laissez pas l'échantillon s'écouler dans les côtés du lit de résine. • Utilisez la colonne immédiatement après avoir terminé l'étape de préparation de la colonne. Ne laissez pas la résine s'assécher ou se fissurer.

6.3. Produits connexes

Le catalogue de GE Santé et son site web présentent une gamme complète de réactifs moléculaires biologiques.
http://www.gehealthcare.com/illustra

Si vous avez besoin de plus amples renseignements, les services techniques de GE seront ravis de vous aider (les numéros de téléphone pour le monde entier se trouvent sur la couverture arrière).

Application	Produit	Code du produit	Taille de l'emballage
Préparation de matrices d'ADN circulaires	illustra TempliPhi™ 100 Trousse d'amplification	25-6400-10	100 réactions
Trousses de réaction de séquençage optimisées pour le système d'analyse d'ADN MegaBACE	DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	US81050	100 matrices
Purification des sondes d'ADN et des oligonucléotides	illustra MicroSpin G-25 Columns	27-5325-01	50 purifications
Purification des sondes d'ADN et des oligonucléotides - suite	illustra ProbeQuant™ G-50 Micro Columns	28-9034-08	50 purifications
	illustra NICK™ Columns	17-0855-02	50 purifications
	illustra NAP™-5 Columns	17-0853-02	50 purifications

Application	Produit	Code du produit	Taille de l'emballage
Purification de l'ADN de PCR, de bandes de gel d'agarose et d'enzymes	illustra GFX™ PCR DNA & Gel Band Purification Kit	28-9034-70	100 purifications
	illustra GFX 96 PCR Purification Kit	28-9034-45	10 × Plaques de 96 puits
Ligature de l'ADN	Ligate-IT Rapid Ligation Kit	US78400	25 réactions
	Ready-To-Go™ T4 DNA ligase	27-0361-01	50 réactions
Clonage par PCR des extrémités franches	Blunt-ended PCR Cloning Kit	RPN5110	40 réactions
Préparation des produits PCR pour le séquençage automatisé	ExoSAP-IT™	US78200	100 réactions
Extraction et purification rapides de l'ADN plasmidique des cultures à petite échelle d' *E. coli*	illustra plasmidPrep Mini Spin Kit	28-9042-70	50 purifications
Purification de l'ADN plasmidique de qualité de transfection d' *E. coli*	illustra plasmidPrep Midi Flow Kit	28-9042-67	25 purifications

GE Santé offices:

GE Santé Bio-Sciences AB
Björkgatan 30 751 84
Uppsala
Sweden

GE Santé Europe GmbH
Munzinger Strasse 5 D-79111 Freiburg
Germany

GE Santé Bio-Sciences Corp
800 Centennial Avenue
P.O. Box 1327
Piscataway
NJ 08855-1327
USA

GE Santé Japan Corporation
Sanken Bldg. 3-25-1 Hyakunincho
Shinjuku-ku
Tokyo 169-0073
Japan

Pour obtenir des informations sur les personnes à contacter en cas de besoin, consultez le site
http://www.gelifesciences.com/contact

GE Santé UK Limited
Amersham Place,
Little Chalfont, Buckinghamshire,
HP7 9NA, UK

http://www.gelifesciences.com

imagination à l'oeuvre

29-1362-52 AC 01/2010

Carte de protocole de référence rapide

illustra™ AutoSeq™ G-50 Dye Terminator Removal Kit

27-5340-01 (50 purifications)
27-5340-02 (250 purifications)
27-5340-03 (1 000 purifications)

A. Protocole pour la purification des réactions de séquençage des trousses de séquençage cyclique DYEnamic™ ET et ABI™ BigDye v3.1

⊕ : Ajouter ↻ : Centrifuger

1. Préparation de la colonne

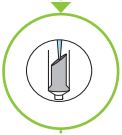
- Remettre la résine en suspension dans la colonne en la faisant tourbillonner
- Desserrer le bouchon d'un quart de tour et enlever la fermeture inférieure en la tournant
- Placer la colonne dans le tube de collecte fourni

↻ 1 minute à 2 000 × g

2. Application de l'écntillon

- Placer la colonne dans un nouveau microtube de centrifugation de 1,5 ml sans DNase (fourni par l'utilisateur)

⊕ 12–25 µl d'échantillon en haut au centre de la résine avec soin



3. Élution

1 minute à 2 000 × g

- Conserver l'éluat
- Conserver l'échantillon purifié à -20 °C

Carte de protocole de référence rapide

illustra™ AutoSeq™ G-50 Terminator Removal Kit

27-5340-01 (50 purifications)
27-5340-02 (250 purifications)
27-5340-03 (1 000 purifications)

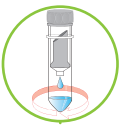
B. Protocole pour la purification des réactions de séquençage de Thermo Sequenase™ Dye Terminator Sequencing Kits

⊕ : Ajouter ↻ : Centrifuger

1. Préparation de la colonne

- Retirer le bouchon supérieur et ajouter 100 µl 10,5 mM d'EDTA (pH 8) à la résine
- Remettre le bouchon en place
- Remettre la résine en suspension dans la colonne en la faisant tourbillonner
- Desserrer le bouchon d'un quart de tour et enlever la fermeture inférieure en la tournant
- Placer la colonne dans le tube de collecte fourni

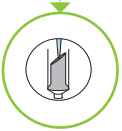
↻ 1 minute à 2 000 × g



2. Application de l'échantillon

- Placer la colonne dans un nouveau microtube de centrifugation de 1,5 ml sans DNase (fourni par l'utilisateur)

⊕ 12–25 µl d'échantillon en haut au centre de la résine avec soin



3. Élution

- 1 minute à 2 000 × g
- Conserver l'éluat
- Conserver l'échantillon purifié à -20 °C

GE imagination à l'oeuvre et GE monogram sont des marques déposées de General Electric Company.

illustra, NICK, AutoSeq, Sephadex, MicroSpin, ProbeQuant, GFX, NAP, DYEnamic et Thermo Sequenase, TempliPhi, MegaBACE et Ready-To-Go sont des marques déposées des sociétés de GE Santé.

Toutes les marques déposées de tiers sont la propriété de leurs propriétaires respectifs.

© 2006–2010 General Electric Company – Tous droits réservés. Édition précédente 2006.
Tous les biens et services vendus sont soumis aux modalités de vente de la société au sein de GE Santé qui les fournit. Un exemplaire des présentes modalités est disponible sur demande. Contactez votre représentant GE Santé pour les informations les plus récentes (voir la couverture arrière pour les coordonnées).

http://www.gelifesciences.com/lifesciences

GE Santé UK Limited.
Amersham Place, Little Chalfont,
Buckinghamshire, HP7 9NA UK

imagination à l'oeuvre